

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年11月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-339259

[ST.10/C]:

[JP 2002-339259]

出 願 人

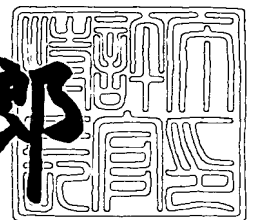
Applicant(s):

大阪大学長

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3028793

【書類名】 特許願

【整理番号】 P102007188

【提出日】 平成14年11月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/19

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市上土室 3 - 2 9 - 2

【氏名】 原島 俊

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市上穂積 1 - 1 - 7 - 1 2 0 4

【氏名】 金子 嘉信

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 5 - 5 - M 3 0 2

【氏名】 杉山 峰崇

【特許出願人】

【識別番号】 391016945

【氏名又は名称】 大阪大学長

【代理人】

【識別番号】 100104673

【弁理士】

【氏名又は名称】 南條 博道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050740

【納付金額】 0円

【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成14年度、
新エネルギー・産業技術総合開発機構、生物機能を活用
した生産プロセスの基盤技術開発、産業活力再生特別措
置法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 染色体の改変方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的配列 (a)、マーカー遺伝子配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (a) をこの順で有する線状化染色体分断ベクター (1) を作成する工程 ;

標的配列 (b)、酵母染色体のセントロメア配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (b) をこの順で有する線状化染色体分断ベクター (2) を作成する工程 ;

および該染色体分断ベクター (1) および (2) を酵母に導入する工程 ; を含み、ここで、n はそれぞれ独立して、6 ~ 10 の整数である ;、

酵母中の染色体の改変方法。

【請求項 2】 前記染色体分断ベクター (1) および染色体分断ベクター (2) が、PCR で得られたベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記 $(C_4 A_2)_n$ 配列 (a) および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (b) の n が両方とも 6 である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記染色体の改変が、酵母染色体の分断 (splitting) および / または脱落 (loss) により引き起こされる、請求項 1 から 3 のいずれかの項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酵母の染色体分断ベクターを用いる、酵母中に存在する染色体の改変方法に関する。さらに、詳しくは、本発明は、2 つの線状化染色体分断ベクターを用いて、染色体を改変する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

組換え DNA 技術の発展によって、遺伝子を自在に改変あるいは加工する技術が発展し、種々の生物において改変遺伝子を導入することが可能となっている。

【0003】

DNAの改変技術には、部位特異的変異誘発、制限酵素による処理、あるいはPCRを用いる方法なども含まれるが、対象となる遺伝子は、10kb程度、大きくても40kb程度の、ごく限られた大きさの遺伝子であり、染色体のような、巨大DNAを自在に改変する技術は、まだ、検討が始まったばかりである。

【0004】

ところで、酵母は、古くから発酵工業に用いられている有用な微生物である。この酵母の染色体を、染色体の分断、脱落などの染色体改変技術により改変することにより、例えば、必要な染色体の数、長さ、量などに関する知見が得られ、ゲノムの構築原理の解明が期待される。この原理が構築されれば、これを利用して、例えば、エネルギーを消費する不要な遺伝子を削除した酵母を宿主として、効率的に物質生産を行うことなどが可能になると期待される。さらに、所望の染色体領域を他の酵母に移植できれば、酵母染色体機能の解析や有用酵母の育種が可能となる。

【0005】

さらに、例えば、酵母人工染色体ベクター（YACベクター）を用いて構築された、植物染色体の巨大DNA（例えば、200kb以上）を含むDNAライブラリーが作成されている。この巨大DNAを、多様な目的に応じて自在に分離、加工することができれば、今までにない有用形質転換植物の創成をはじめとする植物バイオテクノロジーだけでなく、動植物染色体構造の解明、ポジショナルクローニングの迅速化、動植物遺伝子機能検定の簡便化、動植物人工染色体の構築など、動植物基礎生物学をも飛躍的に進展させることが期待される。

【0006】

そこで、酵母の染色体あるいは動植物染色体を対象にして、染色体を改変する試み、例えば、染色体分断の試みがなされている。染色体の安定化の為に末端にテロメア配列が必要であり、従来の染色体分断技術では分断染色体を安定化させる為に、テトラヒメナ rDNA由来のテロメア配列（以下、Tr配列ということがある）に酵母のテロメア配列が高頻度に付加される現象を利用している（非特許文献1参照）。この染色体分断技術の概略を図11で示す。この技術は、セントロメア（C）、逆向きに配位されたテトラヒメナ rDNA由来のテロメア繰

り返し配列 (T r - T r)、酵母形質転換体の選択符号 (M)、任意の標的配列を含むベクターを酵母染色体に形質転換で導入する (図 1 1 (a)) と、標的配列で組換えを起こし (図 1 1 (b))、染色体に導入された T r - T r で解離が起こり (図 1 1 (c))、その後、解離末端に酵母のテロメア配列が付加される (図 1 1 (d)) 現象を基礎としている。

【 0 0 0 7 】

この染色体分断ベクターに用いられるテトラヒメナ r DNA 由来の T r 配列を図 1 2 に示す。T r 配列は、約 7 0 0 b p からなり、A T リッチな約 4 0 0 b p に続いて、約 3 0 0 b p の C C C C A A (C₄A₂) 繰返し配列が続く、この繰返し配列がシグナルとなり、酵母のテロメア配列が高頻度に付加されると考えられている (図 1 2 (a))。なお、6 回の C₄A₂ 繰返し配列 (C₄A₂)₆ でも、その DNA 末端に酵母のテロメア配列が付加されることが報告されている (図 1 2 (b)) (非特許文献 2 参照)。

【 0 0 0 8 】

この図 1 2 (a) で示される事象を利用して、例えば、酵母のセントロメア遺伝子 (C E N 4)、マーカー遺伝子 (U R A 3)、および 2 つの逆向きに配置されたテロメア配列と、そのテロメア配列の間に stuffer DNA として H I S 3 遺伝子とを有する酵母染色体分断ベクター p C S V 1 を用いて、酵母染色体を分断する試みが報告されている (特許文献 1 参照)。

【 0 0 0 9 】

この分断ベクター p C S V 1 を用いる酵母染色体の分断を図 1 3 に示す。図 1 3 において、p C S V 1 は C E N 4 と、U R A 3 (図示せず) と、逆向きに配置された T r と、2 つの T r 配列の間に stuffer DNA (X) とを有している。分断は、まず、分断部位に対応する標的配列 (Y) を分断ベクター p C S V 1 に導入する工程 (Step 1) ; stuffer DNA (X) を除去する工程 (Step 2) ; stuffer DNA (X) を除去したプラスミドを再環状化する工程 (Step 3) ; および再環状化されたプラスミドを標的配列 (Y) 中で切断して線状化し、酵母に導入する工程 (Step 4) ; からなっている。線状化され、酵母細胞内に導入された分断ベクターは、標的配列付近で相同組換えを起こし、ついで、対向するテロメア配列が解離さ

れ、分断されると考えられる。

【 0 0 1 0 】

しかし、上記方法は、複雑な 4 工程の手順を踏む必要があり、しかも、この方法では、(1)分断のたびに標的配列を分断ベクターに逐一クローン化する必要があり、(2)Step 1 の標的配列 Y が導入されたベクター、および Step 3 の再環状化したベクターは、それぞれ、一旦細胞に導入して、増幅しなければならず、そして、(3)さらに染色体への導入効率を上げるために、形質転換のたびに、制限酵素で標的配列内に一箇所切断を入れるという非常に時間のかかる作業を必要とする。このように、上記方法は、煩雑な複数の工程を必要とし、時間がかかるという問題がある。

【 0 0 1 1 】

そこで、テロメア配列(i)－酵母染色体のセントロメア配列－標的配列 (i) をこの順で有する線状化された染色体分断ベクター (A) と、標的配列 (b) －マーカー遺伝子配列－テロメア配列(ii)をこの順で有する線状化された染色体分断ベクター (B) とを調製して、酵母に導入し、染色体の分断を試みた。その結果、染色体の分断が可能なることを見出した。この 2 断片型分断ベクターは、図 1 4 (a)に示すように、標的配列 (δ) －CEN－Tr 配列を有するベクターと、標的配列 (δ) －マーカー遺伝子－Tr 配列を有するベクターから、それぞれの遺伝子を切り出して得られる。従って、例えば、図 1 3 に示すような、染色体分断ベクターを用いる従来の方法に必要とされる複雑な工程は不要となる。

【 0 0 1 2 】

しかし、この 2 断片型分断ベクターは、PCR を用いても、増幅することができなかった (図 1 4 (b)参照)。上記の通り、Tr 配列には約 3 0 0 b p の繰り返し配列が存在するため、PCR を用いても、特異的に 2 断片型分断ベクターを増幅できなかった。そのため、図 1 3 に示される方法よりは、はるかに簡便な 2 断片型分断ベクターを用いる方法でも、未だ、環状ベクターを増幅させ、切断し、DNA 断片を回収しなければならないという操作が残る。

【 0 0 1 3 】

そこで、酵母を宿主として、特に染色体などの、巨大 DNA を簡単に分離し、

加工し、脱落させ、あるいは単離する、より簡単な技術の開発が望まれている。

【 0 0 1 4 】

【特許文献 1】

特開平 1 0 - 8 4 9 4 5 号公報

【非特許文献 1】

Shampayら (1984) Nature (London) 310, 154-157

【非特許文献 2】

Murrayら (1988) Mol. Cell. Biol. 8(11), 4642-4650

【 0 0 1 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、染色体分断ベクターを容易に調製でき、しかも、染色体改変、特に分断 (splitting) と脱落 (loss)、並びに染色体の単離を容易に行うことが可能な方法を提供することにある。

【 0 0 1 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、染色体分断方法、特に、使用する染色体分断ベクターについて鋭意検討したところ、従来用いられていた T r 配列の 1 / 5 ~ 1 / 6 程度の C C C C A A の繰り返し単位であれば、P C R で増幅可能であること、そして、この短い繰り返ししか有していない染色体分断ベクターであっても、T r 配列として機能し、酵母染色体を分断できることを見出して本発明を完成させた。

【 0 0 1 7 】

本発明は、標的配列 (a)、マーカー遺伝子配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (a) をこの順で有する線状化染色体分断ベクター (1) を作成する工程；標的配列 (b)、酵母染色体のセントロメア配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (b) をこの順で有する線状化染色体分断ベクター (2) を作成する工程；、および該染色体分断ベクター (1) および (2) を酵母に導入する工程；を含み、ここで、n はそれぞれ独立して、6 ~ 1 0 の整数である；酵母中の染色体の改変方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

好ましい実施態様においては、前記染色体分断ベクター（１）および染色体分断ベクター（２）が、PCRで得られたベクターである。

【0019】

さらに好ましい実施態様においては、前記 $(C_4 A_2)_n$ 配列（a）および $(C_4 A_2)_n$ 配列（b）の n が両方とも6である。

【0020】

好ましい実施態様においては、前記染色体の改変が、酵母染色体の分断（splitting）および／または脱落（loss）により引き起こされる。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明の染色体改変方法は、染色体分断ベクター（１）および染色体分断ベクター（２）の2断片型染色体分断ベクターを用いる方法である。染色体分断ベクター（１）は、標的配列（a）、マーカー遺伝子配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列（a）をこの順で有し、線状化されている。染色体分断ベクター（２）は、標的配列（b）、酵母染色体のセントロメア配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列（b）をこの順で有し、線状化されている。ここで、染色体分断ベクター（１）および（２）における $(C_4 A_2)_n$ は、Tr配列の繰り返し配列を構成する一単位であるCCCCAAの塩基配列が n 回繰り返された配列を意味し、 n はそれぞれ独立して、6～10の整数である。 n が6であることが最も好ましい。

【0022】

図1に、本発明に用いられる染色体分断ベクター（１）および染色体分断ベクター（２）を示す。この2つの染色体分断ベクター（１）および（２）は、従来用いられていたTr配列よりもはるかに小さいCCCCAAの6～10の繰り返し単位しか有していないにも拘わらず、酵母に同時に導入することにより、テロメア配列として機能し、酵母染色体を分断できる。また、PCRで増幅可能であるため、調製が極めて容易である。

【0023】

（酵母染色体のセントロメア配列）

酵母染色体のセントロメア配列は、酵母染色体の有糸分裂に必要な配列をいい

、どの染色体のセントロメアであっても、特に制限なく用いられる。特に、CEN4、CEN6などが好ましく使用される。酵母染色体のセントロメア配列は、所望のセントロメア配列を有するプラスミド（例えば、pDW26（Windiant, D.ら、J Ferment. Bioeng. 82, 199-204 (1996)）を鋳型とする、PCRで調製される。調製に際し、適切な制限酵素切断部位を含むプライマーを用いれば、所望のセントロメア配列を含む染色体断片が、容易に調製される。

【 0 0 2 4 】

（マーカー遺伝子）

マーカー遺伝子としては、酵母に染色体分断ベクターが導入されたことが確認できるマーカーであれば、特に制限はない。一般的には、例えば、HIS3、HIS5、URA3、ADE2、LEU2、TRP1、LYS2などの栄養要求性マーカー遺伝子などが用いられる。また、真核細胞で発現する薬剤耐性マーカー遺伝子、例えばカナマイシン耐性遺伝子（Km）を用いることもできる。マーカー遺伝子配列は、そのマーカー遺伝子を有するプラスミドを鋳型とする、PCRで調製される。調製に際し、適切な制限酵素切断部位を含むプライマーを用いれば、所望のマーカー遺伝子配列を含むDNA断片が、容易に調製される。

【 0 0 2 5 】

（標的配列）

標的配列は、酵母中に存在する、分断あるいは脱落の対象となる染色体（例えば、酵母染色体、植物染色体、動物染色体など）の分断位置を含む配列に対応する配列をいう。標的配列は、染色体の分断位置に相当する配列を、例えば、適切な制限酵素部位を含むように合成することにより得られる。例えば、適切な制限酵素切断部位を含むように設計されたプライマーを用い、酵母全DNAを鋳型とするPCRにより、所望の標的配列を含むDNA断片が容易に調製される。

【 0 0 2 6 】

（染色体分断ベクター（1）の調製）

染色体分断ベクター（1）は、標的配列（a）、マーカー遺伝子配列、および $(C_4A_2)_n$ 配列（a）をこの順で有する、線状化ベクターである。この染色体分断ベクター（1）は、例えば、適切なマーカー遺伝子を有するベクターを鋳

型として、 $(C_4 A_2)_n$ 配列と標的配列 (a) とをプローブとして、マーカー遺伝子を含むように、PCRを行うことによって、調製される。

【 0 0 2 7 】

染色体分断ベクター (1) の鋳型となるプラスミドは、例えば、最も簡単には、以下のように作成され得る：C.glabrata由来のHIS3遺伝子 (CgHIS3遺伝子) をpUC18に導入したプラスミド (Kitada et al., (1995) Gene 165, 203-206) (以下、このプラスミドを、本明細書ではp1417という) を鋳型として、適切なプライマーを用いて、PCRを行う；次いで、得られたCgHIS3遺伝子を含有するDNA断片を回収し、pBluescript II SK+(STRATAGENE)に挿入する。

【 0 0 2 8 】

得られたマーカー遺伝子を有する染色体分断ベクター (1) を使用した場合、分断された染色体を有する形質転換株は、再度、形質転換の宿主として使用できない。そのため、複数回、形質転換 (染色体の分断) を行うことができない。そこで、形質転換後に、染色体が分断された形質転換株に含まれるマーカー遺伝子を除去することができれば、複数回の形質転換 (染色体の分断) が可能となる。このことにより、例えば、酵母の生育に必要な染色体の数、長さ、量などに関する知見が得られ、酵母染色体機能の解析が期待される。そして、効率的に物質生産などに適した、分断ミニ染色体を有する酵母などの有用酵母の育種が可能となる。

【 0 0 2 9 】

そこで、染色体分断ベクター (1) の鋳型となるプラスミドに、例えば、部位特異的組換え系 (Cre-loxPシステム) を用いた選択符号再利用系遺伝子を組み込み、形質転換終了後に、マーカー遺伝子を除去できるようにすることが、好ましい。このCre-loxPシステムは、プラスミドpUG6 (Guldenerら、(1996) Nucleic Acids Res. 24(13), 2519-2524) に組込まれていることが知られている。図2は、Cre-loxPシステムを示す。図2(a)に示すように、マーカー遺伝子をloxP遺伝子で挟まれるように挿入し、Cre組換え酵素を発現させると、図2(b)に示すような部位特異的組換えが起こり、図2(c)に示すように、マーカー遺伝子が除去される。なお、Cre組換え酵素の発現は、ガラクトース代謝酵素をコードするGA

L1 遺伝子のプロモータによって調節される。

【 0 0 3 0 】

プラスミド pUG6 を用いて、染色体分断ベクター (1) の鋳型となるプラスミドは、例えば、以下のように作成される：(i) CgHIS3 遺伝子を保持するプラスミド p1417 を鋳型として、PCR を行う；(ii) 得られた CgHIS3 遺伝子を含む DNA 断片を、pT7Blue-T vector (Novagen) にクローニングする；(iii) 再度、CgHIS3 遺伝子を含む DNA 断片を切りだし、カナマイシン耐性遺伝子を除去したプラスミド pUG6 の断片に挿入する；(iv) 得られたプラスミドから、CgHIS3 遺伝子を含む DNA 断片を回収し、pBluescript II SK+ (STRATAGENE) に挿入する。これによって、染色体分断ベクター (1) の鋳型となるプラスミドが得られる。

【 0 0 3 1 】

この (i) から (iv) の工程を経て得られる CgHIS3 遺伝子を含むプラスミドには、プラスミド pUG6 に由来する、図 2 に示すような部位特異的組換え系 (Cre-loxP システム) を用いた選択符号再利用系遺伝子が含まれている。従って、このプラスミドを鋳型として、loxP 遺伝子に挟まれたマーカー遺伝子を含むように PCR を行う。このようにして得られた染色体分断ベクター (1) は、繰り返し形質転換が可能となる。

【 0 0 3 2 】

染色体分断ベクター (1) は、マーカー遺伝子を有するプラスミドを鋳型として、分断する酵母染色体の領域と相同性を有する標的配列 (a1) および鋳型プラスミドの相同配列 (a2) を有するプライマー、並びに $(C_4 A_2)_n$ 配列および鋳型プラスミドの相同配列 (a3) を有するプライマーを用いて、PCR を行うことにより、得られる。鋳型プラスミドと相同配列を有する配列 (a2) および (a3) は、マーカー遺伝子配列を挟むように選択される。PCR の条件には特に制限はなく、当業者が通常用いる条件が使用される。

【 0 0 3 3 】

(染色体分断ベクター (2) の調製)

染色体分断ベクター (2) は標的配列 (b)、酵母染色体のセントロメア配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列 (b) をこの順で有する線状化ベクターである。こ

の染色体分断ベクター（２）は、例えば、酵母のセントロメア配列を有するベクターを鋳型とし、 $(C_4 A_2)_n$ 配列と標的配列（b）とをプライマーとして、PCRを行うことによって、調製される。

【 0 0 3 4 】

染色体分断ベクター（２）の鋳型となるプラスミドは、例えば、以下のように作成され得る：適切なプライマーを用いて、酵母の染色体DNAを鋳型にして、PCRを行う；次いで、得られたDNA断片をpT7Blue-T vector (Novagen) にクローニングする；さらに、適切な制限酵素により、CEN4を含むDNA断片を回収し、pBluescript II SK+ (STRATAGENE) に挿入する。これによって、染色体分断ベクター（２）の鋳型となるプラスミドが得られる。

【 0 0 3 5 】

染色体分断ベクター（２）は、酵母セントロメアを有するプラスミドを鋳型として、分断する酵母染色体の領域と相同性を有する標的配列(b1)および鋳型プラスミドの相同配列(b2)を有するプライマー、および $(C_4 A_2)_n$ と鋳型プラスミドの相同配列(b3)を有するプライマーを用いて、PCRを行うことにより、得られる。鋳型プラスミドと相同性を有する配列(b2)および(b3)は、酵母セントロメア配列を挟むように選択される。

【 0 0 3 6 】

（酵母染色体の分断方法）

本発明の方法を、図３に基づいて、 $(C_4 A_2)_6$ 配列をプライマーとして用いる場合について、模式的に説明する。まず、図３(a)に示すように、標的配列(a)、標的配列(b)、および $(C_4 A_2)_6$ 配列を有する配列をプライマーとして、マーカー遺伝子(M)、あるいはセントロメア配列(CEN4)を有するプラスミドを鋳型として、染色体分断ベクター（１）および染色体分断ベクター（２）を調製する。次に、図３(b)に示すように、この染色体分断ベクター（１）および（２）を酵母に導入する。導入された染色体分断ベクターは、酵母染色体中の相同性のある部位で相同組換えを起こし、染色体に導入され、図３(c)に示すように、組換え前に、あるいは組換え後に、 $(C_4 A_2)_6$ 配列に酵母のテロメア配列が付加されて、染色体として機能し得るようになると考えられる。なお、

プライマー中の標的配列(a)または(b)は、染色体の組換えが生じたときに、分断ベクターの $(C_4 A_2)_6$ 配列が2つに分断されたそれぞれの染色体の末端に配置されるように、その向きが決定される。

【 0 0 3 7 】

(酵母染色体の分断・脱落)

本発明の染色体分断ベクターを用いる、酵母染色体の分断・脱落について説明する。染色体を分断する場合、染色体の脱落を伴わない場合と、染色体の脱落を伴う場合とがある。染色体の分断・脱落の様式を、図4に例示する。例えば、図4(A)において、標的配列(b)が分断位置を挟んで分断位置の左側の染色体配列を有し、標的配列(a)が分断位置の右側の染色体配列を有するように、標的配列(a)および(b)を構成する。このような標的配列(a)および(b)をそれぞれ有する線状化された染色体分断ベクター(1)および(2)を同時に酵母に導入することにより、図4(A)の下段に示されるような染色体の分断が生じると考えられる。

【 0 0 3 8 】

また、染色体分断ベクター(1)あるいは(2)が、例えば、図4の(B)および(C)に示されるように、単独で、分断・脱落に関与することも考えられる。これらの図4に示す様式(A)～(C)が、単独で、あるいは複合して、さらには、その他の様式で、染色体の分断・脱落が起こると考えられる。

【 0 0 3 9 】

さらに、得られた分断染色体を有する形質転換体が部位特異的組換え系(Cre-loxPシステム)を含む場合、Cre酵素を発現させてマーカー遺伝子を除去し、次の染色体分断ベクターを導入してもよい。

【 0 0 4 0 】

【実施例】

以下、本発明を、実施例を挙げて説明するが、本発明がこの実施例に限定されないことはいうまでもない。

【 0 0 4 1 】

(PCRの条件)

以下の参考例および実施例において、PCRによるDNA断片の増幅および染色体分断ベクター（１）および（２）の調製は、以下の条件で行った。

Takara EX Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ l、10×Reaction緩衝液（Takara EX Taq DNAポリメラーゼ付属緩衝液）4 μ l、dNTP混合液（dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各2.5mM）4 μ l、鋳型DNA 0.2 μ l、２種類のプライマーDNA（各20pmol/ μ l）各2 μ lを0.2 mlの専用チューブに入れ、無菌水で40 μ lに調製した。GeneAmp PCR System（PERKIN ELMER）にセットし、１）94℃、3分；２）94℃、1分（２本鎖DNAの変性）；３）50～60℃、2分（プライマーのアニーリング）；４）72℃、1～3分（ポリメラーゼによるDNAの伸張）および５）4℃、10分；の反応を25回繰り返して行った。

【0042】

（使用酵母および分断する染色体）

分断する染色体を、一倍体出芽酵母の染色体16本のうち一番小さい第一番染色体（230195 bp）に定め、使用する選択符号はCgHIS3遺伝子に、分断点はそのほぼ中央部（第一番染色体119874 bpと119875 bpの間）に設定した。期待通りに分断されると、第一番染色体は、約120kbpと約110kbpとに分断される。なお、一倍体出芽酵母は、SH5209（a）株（旧FY833株：MATa his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63（Winstonら，（1995）Yeast 11,53-55）である。

【0043】

参考例１：染色体分断ベクター（１）を調製するための鋳型となるプラスミドpSK+CgHIS3の構築

プラスミドpSK+CgHIS3は、Cre-loxPシステムのloxP部位に組込まれたCgHIS3遺伝子を、pBluescript II SK+（STRATAGENE）に組込むことによって得られるプラスミドである。

【0044】

まず、以下の配列を有するCgHIS3-1およびCgHIS3-2：

CgHIS3-1：5'-CTCTCTAGATAACACCGATCAGATGCACA-3'（配列番号１）

CgHIS3-2：5'-CTCCTCGAGAACTTGCTCTGCTAACTCA-3'（配列番号２）

をプライマーとして用いて、CgHIS3遺伝子を保持するプラスミドp1417を鋳型と

して、PCRを行った。得られた約1.62kbpのDNA断片を、T4 DNAリガーゼを用いてpT7Blue-T vector (Novagen) にクローニングすることによって、pT7-CgHIS3を構築した。なお、プライマーとして用いたCgHIS3-1には、XbaI切断部位を生じる配列が組み込まれている。同様に、プライマーとして用いたCgHIS3-2には、XhoI切断部位を生じる配列が組み込まれている。

【 0 0 4 5 】

つぎに、得られたpT7-CgHIS3を制限酵素XbaI/XhoIで消化した。アガロースゲルを用いるGENE CLEAN II KIT (フナコシ株式会社製) により、CgHIS3遺伝子を含む約1.62kbpのDNA断片を回収した。次に、pUG6をBglII/XhoIおよびXbaI/XhoIで消化して、カナマイシン耐性遺伝子を含む約1.54kbpが除去された断片を、アガロースゲルからGENE CLEAN II KIT (フナコシ株式会社) を用いて回収した。そして、回収したpUG6のXbaI/XhoI切断部位に、CgHIS3遺伝子を含む約1.62kbpのDNA断片を挿入して、pUG6-CgHIS3を構築した。

【 0 0 4 6 】

得られたpUG6-CgHIS3をNotIで消化することによって得られるCgHIS3遺伝子を含んだ約1.79kbpのDNA断片を、pBluescript II SK+(STRATAGENE)のNotI部位に挿入することによって、プラスミドpSK+CgHIS3構築した。

【 0 0 4 7 】

参考例2：染色体分断ベクター(2)を調製するための鋳型となるプラスミドpSK+CEN4の構築

プラスミドpSK+CEN4は、酵母のセントロメア配列を有するプラスミドであり、染色体分断ベクター(2)を調製する際の鋳型となるプラスミドである。このプラスミドは、pBluescript II SK+(STRATAGENE)にセントロメアとしてのCEN4遺伝子が組み込まれているプラスミドである。

【 0 0 4 8 】

まず、以下の配列を有するCEN4-1およびCEN4-2：

CEN4-1： 5'- CTCGAATTCGGCCATTCTCATGAAGAATA-3' (配列番号3)

CEN4-2： 5'- CTCGAATTCTCTAAGAGGTGATACTTATT-3' (配列番号4)

をプライマーとして用いて、出芽酵母野生型株S288Cの染色体DNAを鋳型

にして、PCRを行った。得られた約0.85kbpのDNA断片を、T4 DNAリガーゼを用いてpT7Blue-T vector (Novagen) にクローニングすることによって、pT7-CEN4を構築した。なお、CEN4-1およびCEN4-2には、EcoRI切断部位が組み込まれている。

【 0 0 4 9 】

つぎに、得られたpT7-CEN4をEcoRIで消化して、CEN4を含む約0.85kbpのDNA断片を回収した。このDNA断片を、pBluescript II SK+ (STRATAGENE) のEcoRI部位に挿入することによって、プラスミドpSK+CEN4を構築した。

【 0 0 5 0 】

(実施例1：染色体分断ベクターの作成)

図5に、染色体分断ベクター(1A)、(2A)、(1B)および(2B)の作成の模式図を示す。

【 0 0 5 1 】

(染色体分断ベクター(1A)の作成)

以下のプライマー：

chIY-11：5'-GAATGCTATGTTGTGGTTAGCGACCTGCCCCCTTGCCAAATCTATATCACCCTTCCTTAGCATGTAATCATTTACTTAAAGGAAACAGCTATGACCATG-3' (配列番号5)、および

Tr6-1：5'-CCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAATCGAGGTCGACGGTATCGAT-3' (配列番号6)を用いた。プライマーchIY-11の5'側の80塩基は、標的配列である第一番染色体の119795bp-119874bpの塩基配列とのホモロジー領域を示し、残りの19塩基はプラスミドpSK+CgHIS3とのホモロジー領域である。プライマーTr6-1は、 $(C_4A_2)_6$ 配列と20塩基のプラスミドpSK+CgHIS3とのホモロジー領域を有している。この2つのプライマーを用いて、プラスミドpSK+CgHIS3を鋳型として、PCRを行い、PCR産物1を得た。

【 0 0 5 2 】

(染色体分断ベクター(2A)の作成)

以下のプライマー：chIy-12：5'-GTTGAAAAGGAAATCAACGTTACAAAGTGCAGTTTTTTGTATTATTTTCCTATTATCCTCTTCTTTTCCTTTGTTTCAGGGGAAACAGCTATGACCATG-3' (配列番号7)、およびプライマーTr6-1 (配列番号6)を用いた。プライマーchIY-12の

5'側の80塩基は、標的配列である第一番染色体の119875bp-119754bpの塩基配列とのホモロジー領域を示し、残りの19塩基はプラスミドpSK+CEN4とのホモロジー領域である。この2つのプライマーを用いて、プラスミドpSK+CEN4を鋳型として、PCRを行い、PCR産物2を得た。

【0053】

(染色体分断ベクター(2B)の作成)

以下のプライマー：

chIY-13：5'-TTTAAGTAAATGATTACATGCTAAGGAAGTGGTGAATAAGATTTGGCAAGGGGCAGGTCGCTAACCACAACATAGCATTTCGGAAACAGCTATGACCATG-3' (配列番号8)、およびプライマーTr6-1 (配列番号6)を用いた。プライマーchIY-13の5'側の80塩基は、標的配列である第一番染色体の119795bp-119874bpの塩基配列とのホモロジー領域を示し、残りの19塩基はプラスミドpSK+CEN4とのホモロジー領域である。この2つのプライマーを用いて、プラスミドpSK+CEN4を鋳型として、PCRを行い、PCR産物3を得た。

【0054】

(染色体分断ベクター(1B)の作成)

以下のプライマー：

chIY-14：CCTGAAACAAAGGAAAAGAAGAGGATAATAGGAAAATAATACAAAAAACTGCACTTTGTAACGTTGATTTCTTTTCAACGGAAACAGCTATGACCATG-3' (配列番号9)、およびプライマーTr6-1 (配列番号6)を用いた。プライマーchIY-14の5'側の80塩基は、標的配列である第一番染色体の119875bp-119754bpの塩基配列とのホモロジー領域を示し、残りの19塩基はプラスミドpSK+CgHIS3とのホモロジー領域である。この2つのプライマーを用いて、プラスミドpSK+CgHIS3を鋳型として、PCRを行い、PCR産物4を得た。

【0055】

図5に、PCR産物1～4の電気泳動写真を示す。それぞれ、約2.1kbpの大きさの断片 (PCR産物1および4)、および1.2kbpの大きさの断片 (PCR産物2および3) が特異的に増幅しており、 $(C_4A_2)_6$ の繰り返し配列をプライマーとして用いたPCRによって、特異的に増幅されることが明らかとなった。

これによって、染色体分断ベクター（１）および（２）が、ＰＣＲによって調製できることが、明らかとなった。

【 0 0 5 6 】

得られた染色体分断ベクター（１Ａ）および（２Ａ）は、図６（ａ）に示されるように、分断によって生じたそれぞれの染色体に、標的配列が生成されるタイプの分断（以下、（Ａ）タイプの分断という）を行うベクターである。染色体分断ベクター（１Ｂ）および（２Ｂ）は、図６（ｂ）に示すように、分断によって生じたそれぞれの染色体に、標的配列が生成されないタイプの分断（以下、（Ｂ）タイプの分断という）を行うベクターである。

【 0 0 5 7 】

（実施例２：酵母染色体の分断－１）

上記ＰＣＲで得られた染色体分断ベクター（１Ａ）および（２Ａ）、または染色体分断ベクター（１Ｂ）および（２Ｂ）をそれぞれセットにして、酵母株ＳＨ５２０９に酢酸リチウム法を用いて形質転換し、Ｈｉｓ欠損培地で生育する株（期待通り第一番染色体が分断されたと思われる株）を探索した。染色体分断ベクター（１Ａ）および（２Ａ）を用いてＡタイプの分断を行った場合、６株の形質転換体を得られた。他方、染色体分断ベクター（２Ｂ）および（１Ｂ）を用いるＢタイプの分断では、４株の形質転換体を得られた。

【 0 0 5 8 】

次にこれらの形質転換体において第一番染色体が期待通りに分断されているかを調べる為に、パルスフィールドゲル電気泳動解析（ＰＦＧＥ）およびサザン解析を行った（図７）。期待通りに分断されると、第一番染色体が約１２０ｋbpと約１１０ｋbpに分断される。ＰＦＧＥ解析の結果、（Ａ）タイプの分断では２株（図７：レーン２および４）において、（Ｂ）タイプの分断でも２株（図７：レーン１０および１１）において、第一番染色体のバンドが消失しており、代わりに約１２０ｋbp付近に新しいバンドが生成していた。第一番染色体が期待通り分断されると、約１２０ｋbpと約１１０ｋbpの二つに分断されるはずであるが、おそらくこの二つのバンドは約１２０ｋbp付近で重なっているものと考えられる。そこで、サザン解析を行った。その結果、約１１０ｋbpの分断染色体に含まれると思われるＣｇＨＩＳ３をプロ-

ブとした解析でも、約120kbpの分断染色体に含まれると思われるCEN4をプローブとした解析でも、レーン2、4、10および11において、約120kbp付近にシグナルが得られた。よって、CgHIS3を含む分断染色体（約110kbp）とCEN4を含む分断染色体（約120kbp）とは重なっており、レーン2、4、10および11の形質転換株においては、期待通り第一番染色体が分断されていることが分かった。

【0059】

なお、CEN4をプローブとした解析において、第四番染色体がすべてのレーンにおいて検出されなかった。これは第四番染色体が非常に大きく（約1.5 Mbp）、サザン解析用メンブレンに転写されにくかった為と考えられる。また、レーン5、6、8、および9の形質転換株では第一番染色体が分断されていなかったが、これはCgHIS3をプローブとしたサザン解析から、第一番染色体とは異なる染色体にCgHIS3遺伝子が導入された為、これらの株がHis⁻欠損培地で生育できたと考えられる。さらに、レーン7の形質転換株では、第一番染色体は分断されていないが、CgHIS3を含む分断染色体（約110kbp）を余分に保持している為、His⁻欠損培地で生育できたと考えられる。これらの結果をまとめると、（A）タイプの分断ベクターでは1/3の確率で、（B）タイプの分断ベクターでは1/2の確率で酵母第一染色体が分断されており、（A）および（B）の両タイプにおける分断効率の差はほとんど見られなかった。このように、PCRを用いて簡便に調製した分断用断片を用いて、高頻度で染色体を分断できることが明らかとなった。

【0060】

（実施例3：染色体分断ベクター（1C）および（2C）の作成）

（染色体分断ベクター（1C）の作成）

図8に染色体分断ベクター（1C）の作成の模式図を示す。以下のプライマー：chIY-15：5'-CAAGAAATATCTTGACCGCAGTGAAGTGTGGGAATACTCAGGTATACAGCTATGACCATG-3'（配列番号10）、およびTr6-1（配列番号6）を用いた。プライマーchIY-15の5'側の45塩基は、標的配列である第一番染色体の181165bp-181209bpの塩基配列とのホモロジー領域を示し、残りの15bpはプラスミドpSK+CgHIS3とのホモ

ロジー領域である。このプライマーを用いて、プラスミドpSK+CgHIS3を鋳型として、PCRを行い、PCR産物5を得た。

【 0 0 6 1 】

(染色体分断ベクター (2C) の作成)

図8に染色体分断ベクター (2C) の作成の模式図を示す。以下のプライマー: chIY-16: 5'-GAAAAAATAATGGTTGCTAAGAGATTGAACTCTTGATCTTACGACAGCTATGACCATG-3' (配列番号11)、およびTr6-1 (配列番号6) を用いた。pSK+CEN4を鋳型として、PCRを行った。プライマーchIY-16の5'側の45塩基は、標的配列である第一番染色体の181210bp-181254bpの塩基配列との相同配列を示し、残りの15塩基はプラスミドpSK+CEN4との相同配列を示す。このプライマーを用いて、プラスミドpSK+CEN4を鋳型として、PCRを行い、PCR産物6を得た。

【 0 0 6 2 】

図8に、PCR産物5およびPCR産物6の電気泳動写真を示す。それぞれ、約2.0kbpおよび約1.2kbpの大きさの断片が特異的に増幅しており、染色体分断ベクター (1C) および (2C) が得られたことを確認した。

【 0 0 6 3 】

得られた染色体分断ベクター (1C) および (2C) は、図6 (b) に示される (B) タイプの分断を行うベクターである。期待通りに分断されると、図8に示すように、第一番染色体が181209bpと181210bpとの間で分断され、約180kbpと約50kbpとに分断される。

【 0 0 6 4 】

(実施例4: 酵母染色体の分断-2)

染色体分断ベクター (1C) および (2C) を酵母株SH5209に酢酸リチウム法を用いて形質転換し、His欠損培地で生育する株を探索した。多数の形質転換体が多量に得られたので、任意に24株を選び、PFGEを行った。結果を図9に示す。レーン8の形質転換株において第一番染色体のバンドが消失しており、代わりに約180kbp付近と約50kbp付近に新しいバンドが生成していた。そこで、詳細に調べる為に、サザン解析を行った (図10)。その結果、レーン8の形質転換株において、CgHIS3をプローブとした解析では約180kbp付近で、CEN4を

プローブとした解析では約50kbp付近で、それぞれシグナルが得られた。これらの結果より、レーン 8 の形質転換株は、期待通りに、第一番染色体が約180kbpと約50kbpとに分断されていることが分かった。よって、4 5 m e r のホモロジー領域を持つ分断法でも、1 / 2 4 の割合で期待通り分断できるということが分かった。

【 0 0 6 5 】

なお、第一番染色体中央部での分断（実施例 2）と比べて、実施例 4 では分断株の出現率が低かったが、これには以下の 3 つの原因：1）分断部位の構造が異なるなどの要因で、分断効率が大きく左右されること；2）染色体とのホモロジー領域の長さが 8 0 塩基から 4 5 塩基と半分程度に減少したこと；3）今回の分断では生育のために必要な遺伝子（以下、必須遺伝子という）が分断染色体に分配されなかったこと；が考えられる。

【 0 0 6 6 】

得られた約50kbpの分断された染色体には、必須遺伝子は存在しない。従って、たとえ、CgHIS3を有する染色体分断ベクター（1 C）と組換えを起こしても、CEN 4 を有する染色体分断ベクター（2 C）とは組換えを起こす必要がなくなる。ところが、第一番染色体中央部での分断では、必須遺伝子が分断染色体に分配されることから、CgHIS3を有する分断用断片とのみ組換えを起こすと、この必須遺伝子を消失してしまうことから生存できない。よって、必須遺伝子の分配を伴わない第一番染色体右腕約50kbpでの分断（実施例 4 の分断）のほうが、必須遺伝子の分配を伴う第一番染色体中央部での分断よりも、His欠損培地で生育する擬陽性（レーン 2、3、2 1、2 2、2 3、2 4 など）の形質転換株が増加し、結果として分断株の収率が低下したと考えられる。あるいは、これらの擬陽性形質転換体は、期待通りに約180kbpと約50kbpとに分断されたが、この約50kbpの断片には必須遺伝子が存在しない為、その後培養中に約50kbpの断片が消失したということも考えられる。しかし、いずれにしても、4 5 塩基のホモロジー領域をもつ断片を用いても、期待通り染色体が分断された形質転換株が得られた。

【 0 0 6 7 】

【発明の効果】

従来、PCRで特異的に増幅することができなかった繰り返し配列 (C_4A_2) (Tr 配列) を有するDNA断片が、 $(C_4A_2)_n$ の n を 6 ~ 10 とすることにより、PCRで特異的に増幅できることを見出した。そして、この $(C_4A_2)_n$ 配列をプライマーとして用いると、PCRで簡単に染色体分断ベクターが増幅できることを見出した。従って、本発明は、図13に示すような、染色体分断ベクターの調製に複雑な多段階の工程が必要とされる従来の方法、あるいは Tr 配列を有する2断片型染色体分断ベクターを、PCRを用いることなく調製する方法と比べると、染色体分断ベクターの調製を飛躍的に簡素化し得る。しかも、このPCRで増幅された $(C_4A_2)_n$ ($n = 6 \sim 10$) 配列を染色体分断ベクターとして酵母に導入することによって染色体が分断され、分断染色体に取りこまれた $(C_4A_2)_n$ 配列には、酵母のテロメア配列が結合されていると考えられるので、分断染色体として機能できる。本発明の方法は、例えば、酵母内にクローニングされた植物遺伝子、動物遺伝子の分断、分離に利用できる。有用形質転換微生物あるいは動植物の創生、染色体の構造解析の加速、植物人工染色体の構築の加速、ポジショナルクローニングの迅速化、微生物、動植物遺伝子の機能試験の精密化あるいは簡便化などの、酵母あるいは動植物に関する研究のみならず、さらに、ヒトの染色体の研究および医療への応用などにも有用である。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director General of Osaka University

<120> Method for manipulating chromosomes

<130> P102007188

<160> 11

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ctctctagat aacaccgatc agatgcaca	29
<210> 2	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 2	
ctcctcgaga aacttgctct gctaactca	29
<210> 3	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 3	
ctcgaattcg gccattctca tgaagaata	29
<210> 4	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 4	
ctcgaattct ctaagagggtg atacttatt	29
<210> 5	
<211> 99	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 5	
gaatgctatg ttgtgggttag cgacctgccc cttgccaaat ctatatcacc acttccttag	60
catgtaatca tttacttaaa ggaaacagct atgaccatg	99
<210> 6	
<211> 56	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ccccaacccc aaccccaacc ccaaccccaa cccaatcga ggtcgacggt atcgat 56

<210> 7

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gttgaaaagg aaatcaacgt tacaaagtgc agttttttgt attattttcc tattatcctc 60

ttcttttctt ttgtttcagg ggaaacagct atgaccatg 99

<210> 8

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tttaagtaaa tgattacatg ctaaggaagt ggtgaataag atttggcaag gggcaggctcg 60

ctaaccacaa catagcattc ggaaacagct atgaccatg 99

<210> 9

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cctgaaacaa aggaaaagaa gaggataata ggaaaataat acaaaaaact gcactttgta 60

acgttgattt ccttttcaac ggaaacagct atgaccatg 99

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

caagaaatat cttgaccgca gtgaactgtg ggaatactca ggtatacagc tatgaccatg 60

<210> 11

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gaaaaaataa tgggttgctaa gagattcgaa ctcttgcac ttacgacagc tatgaccatg 60

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に用いられる染色体分断ベクターの模式図である。

【図 2】

Cre-loxPシステムによるマーカー遺伝子の削除様式を示す図である。

【図 3】

本発明の方法を用いる染色体の分断を示す模式図である。

【図 4】

酵母染色体の分断・脱落の様式を示す模式図である。

【図 5】

染色体分断ベクターのPCRによる作成の模式図、およびPCR産物の電気泳動写真である。

【図 6】

染色体分断ベクターの分断様式を示す模式図である。

【図 7】

形質転換体の染色体のパルスフィールドゲル電気泳動写真（PFGE）およびサザン解析の写真である。

【図 8】

別の染色体分断ベクターのPCRによる作成の模式図およびPCR産物の電気泳動写真である。

【図 9】

形質転換体の染色体のパルスフィールドゲル電気泳動写真（PFGE）である

【図 1 0】

図 9 の P F G E の サザ ー ン 解 析 を 示 す 写 真 で あ る。

【図 1 1】

染 色 体 分 断 の 基 本 原 理 を 示 す 模 式 図 で あ る。

【図 1 2】

テトラヒメナのテロメア配列およびその配列への酵母テロメア配列の付加を示す模式図である。

【図 1 3】

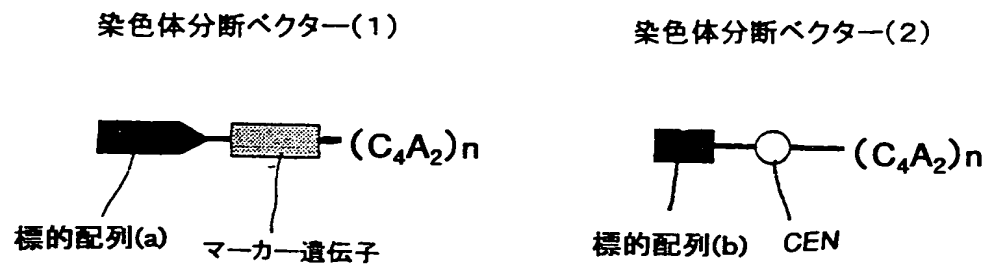
p C S V 1 を 用 い る、従 来 の 染 色 体 分 断 方 法 を 示 す 模 式 図 で あ る。

【図 1 4】

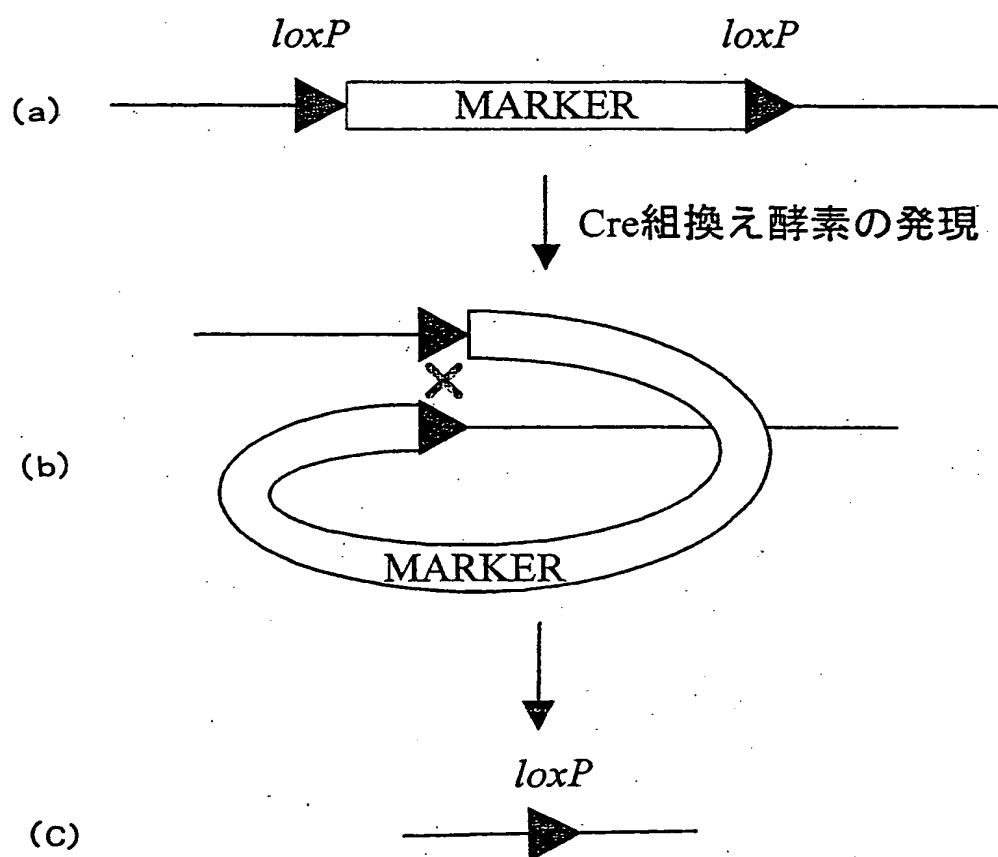
T r 配 列 を 有 す る 2 断 片 型 分 断 ベ ク タ ー を 用 い る 従 来 の 染 色 体 分 断 方 法 お よ び
こ の 2 断 片 型 分 断 ベ ク タ ー に つ い て P C R を 行 っ た と き の 電 気 泳 動 写 真 で あ る。

【書類名】 図面

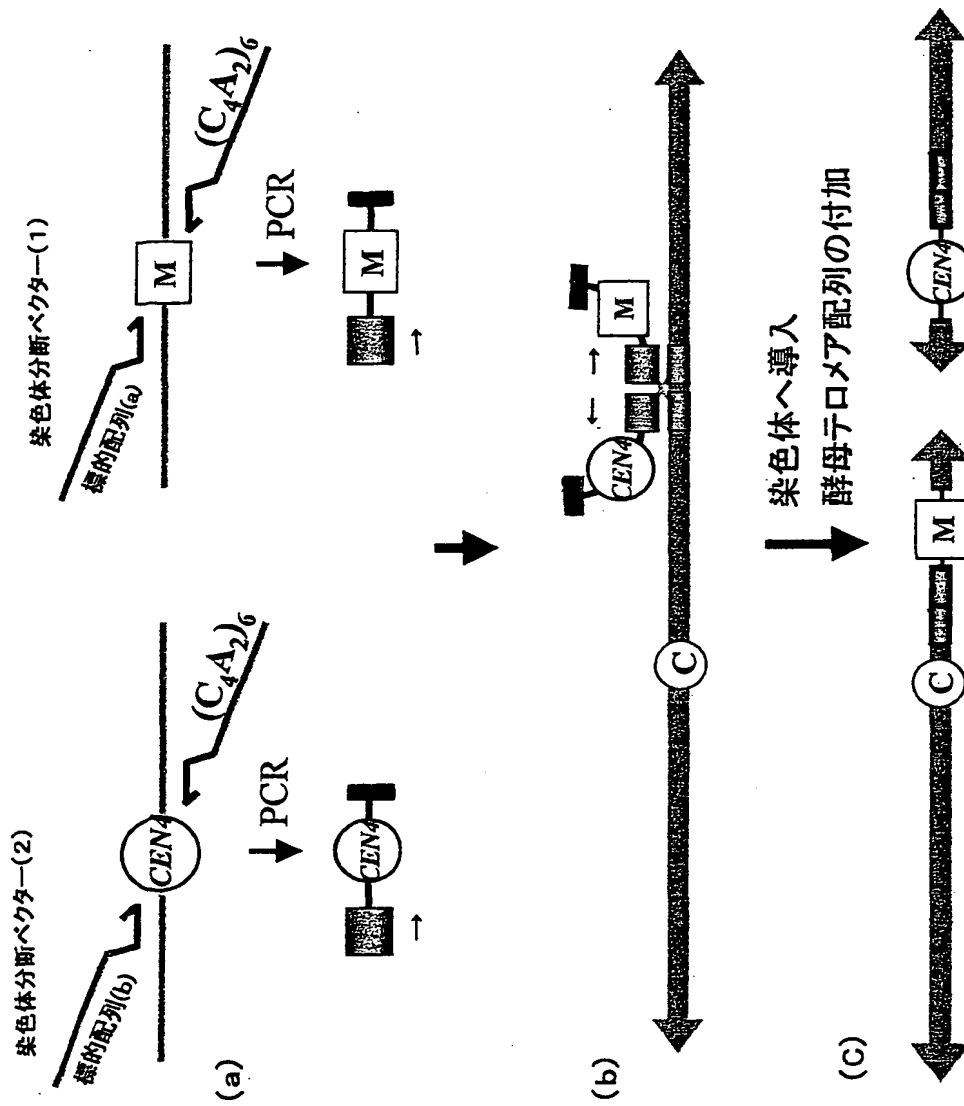
【図 1】



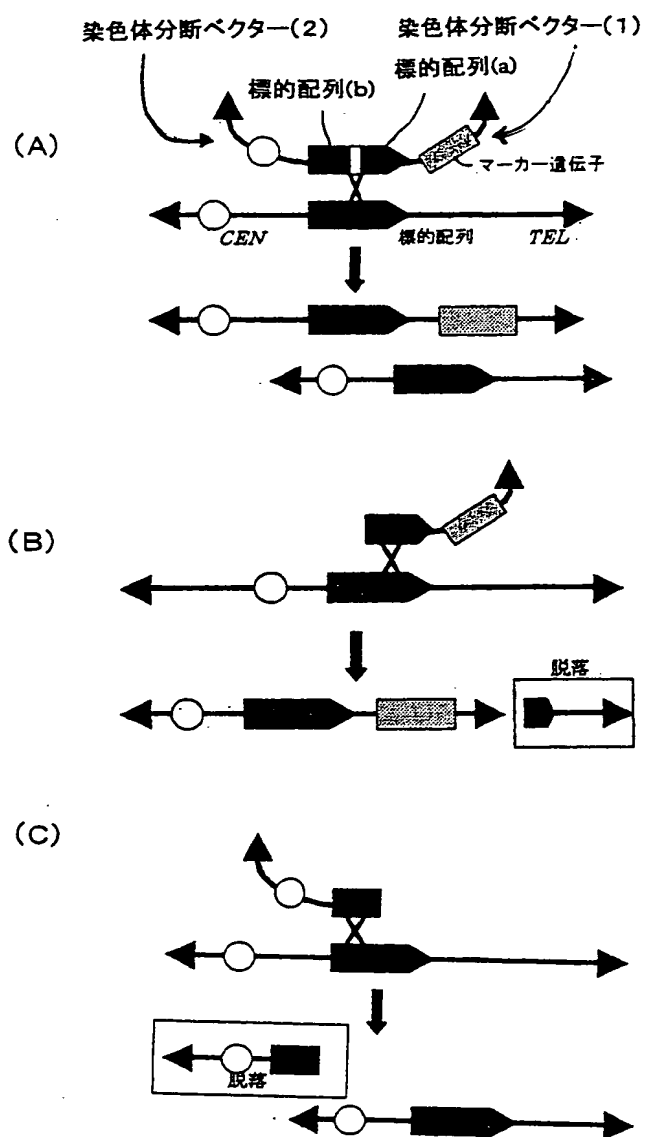
【図 2】



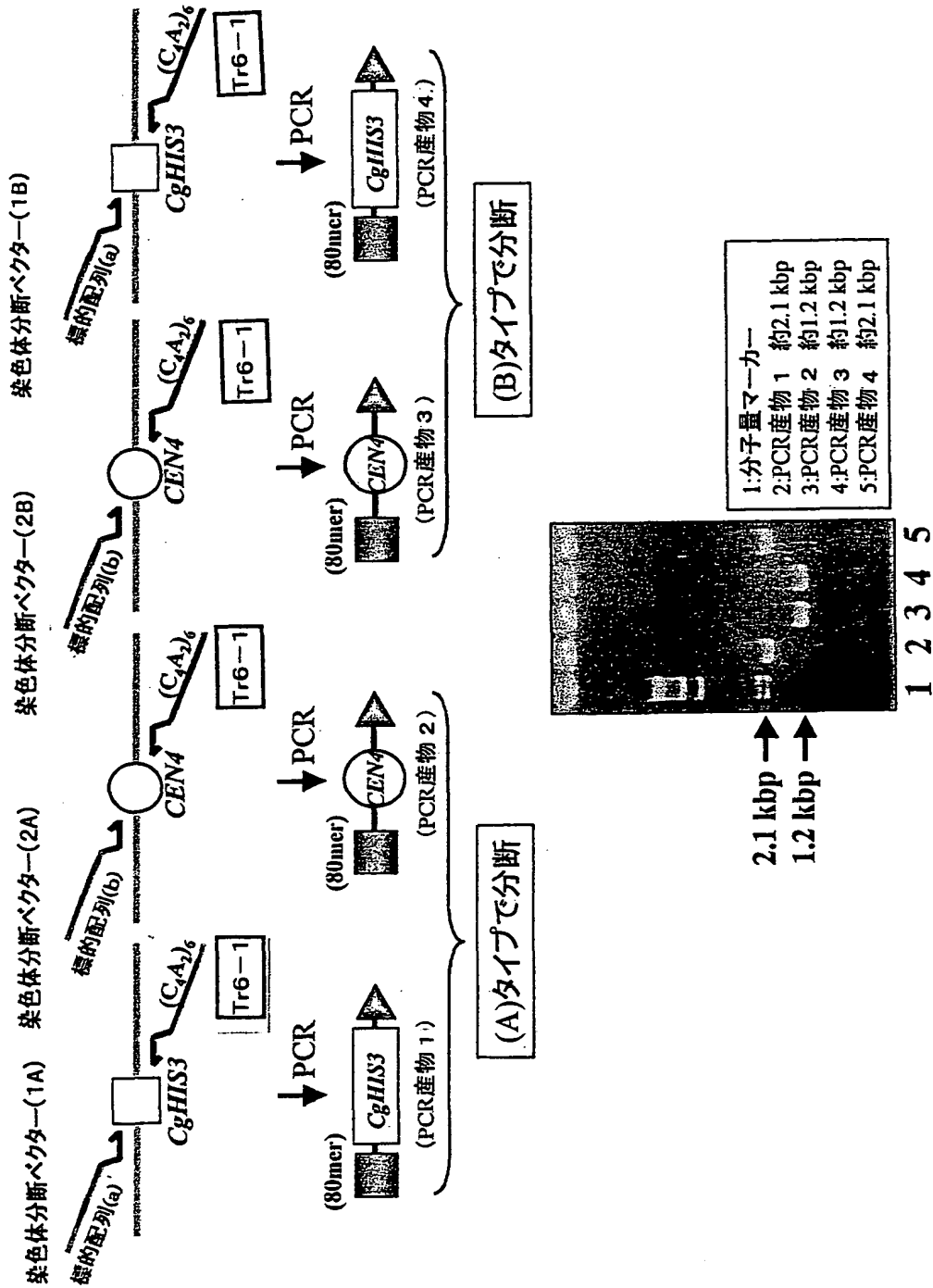
【図 3】



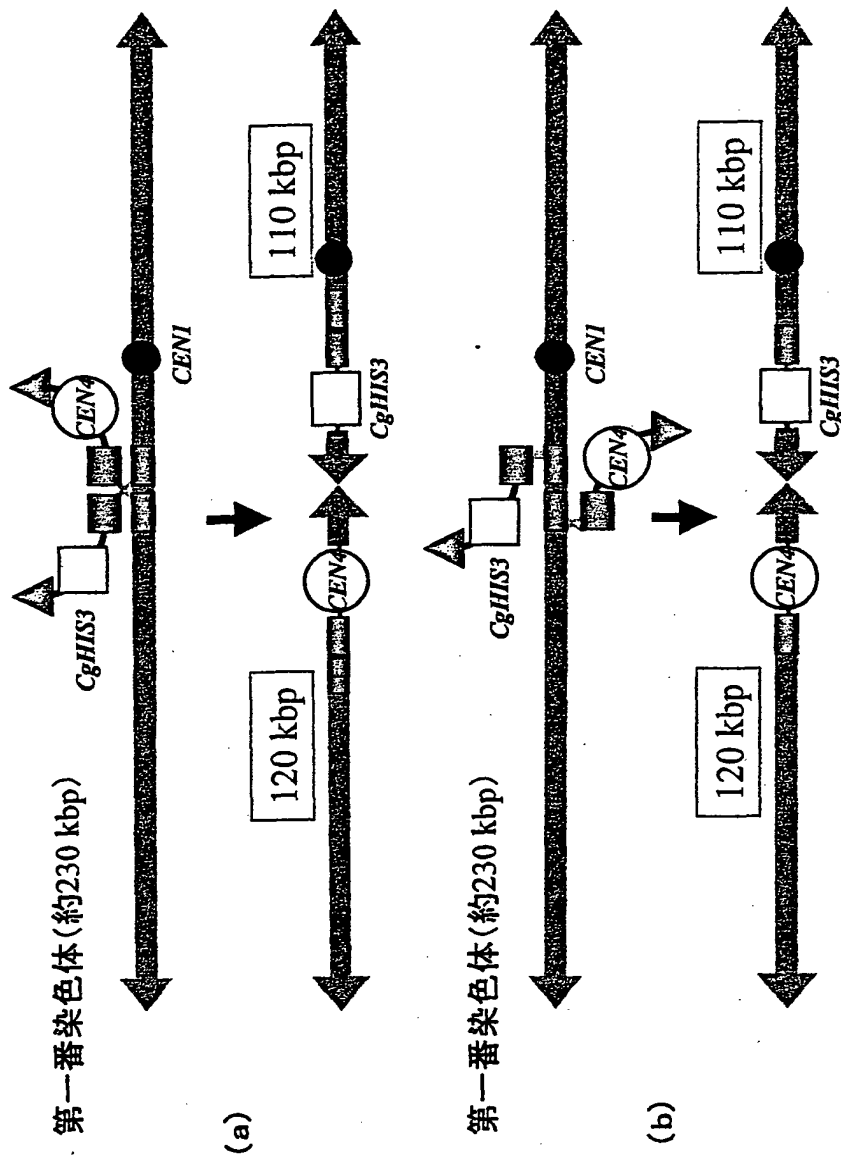
【図 4】



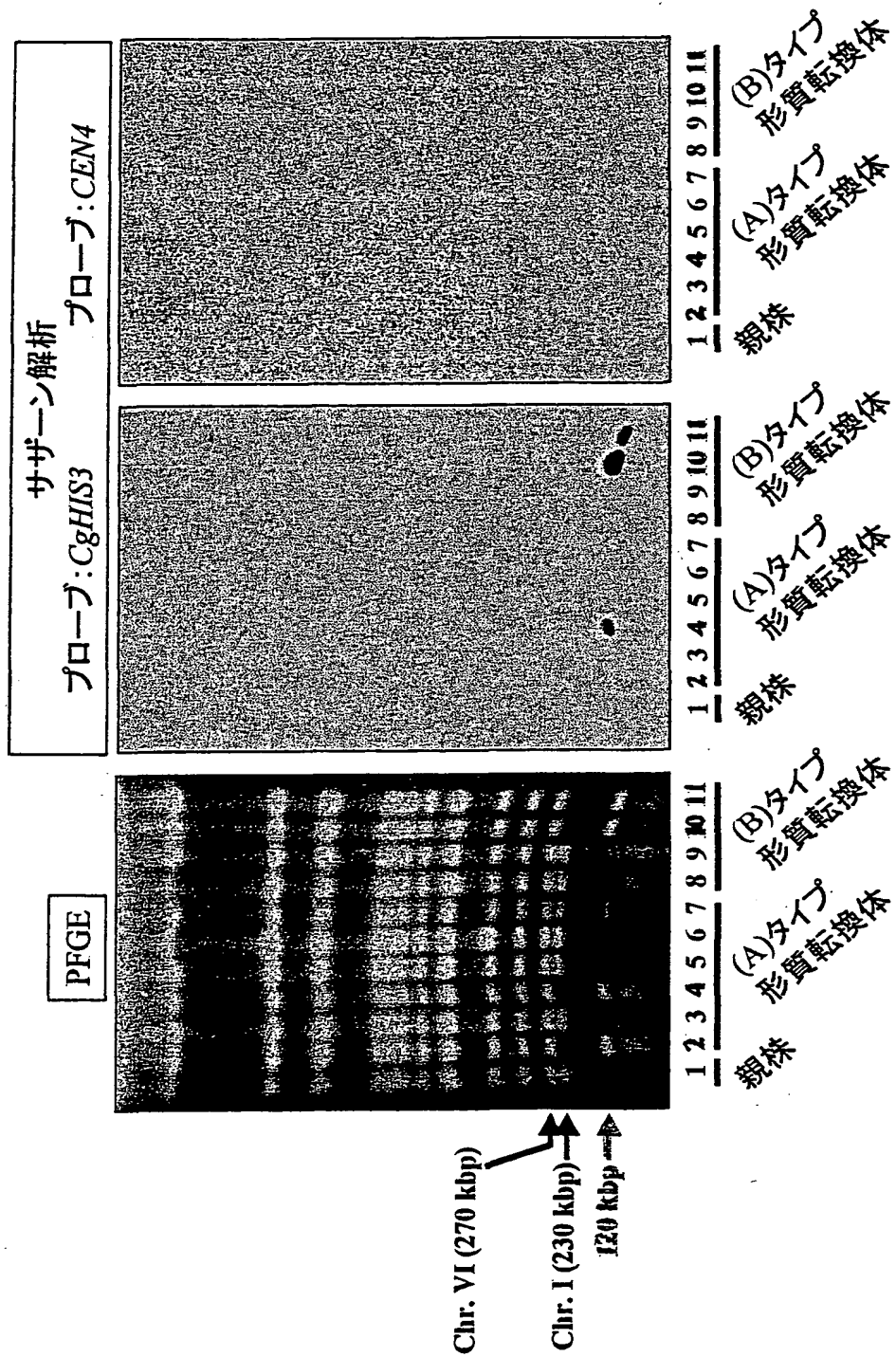
【図 5】



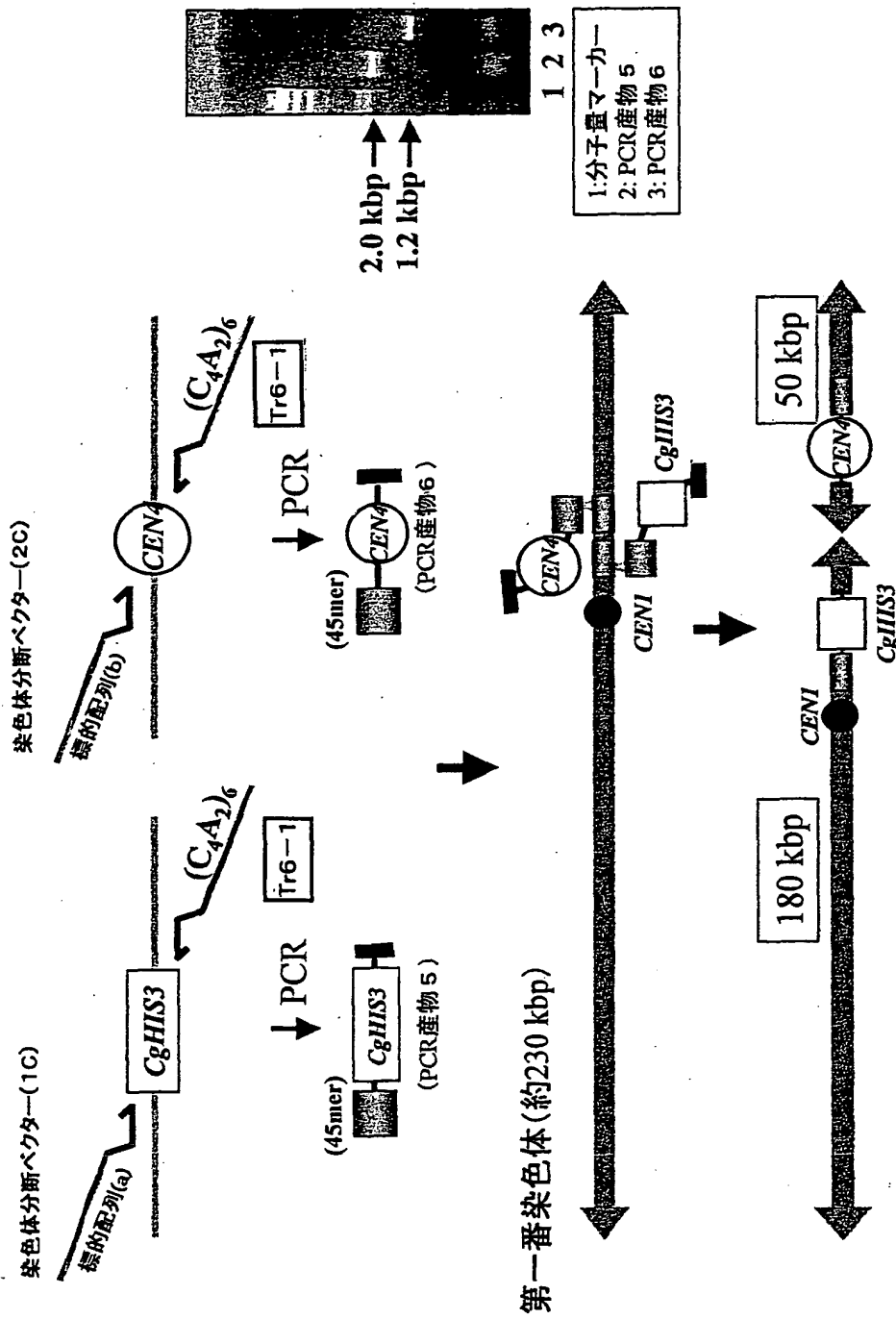
【図 6】



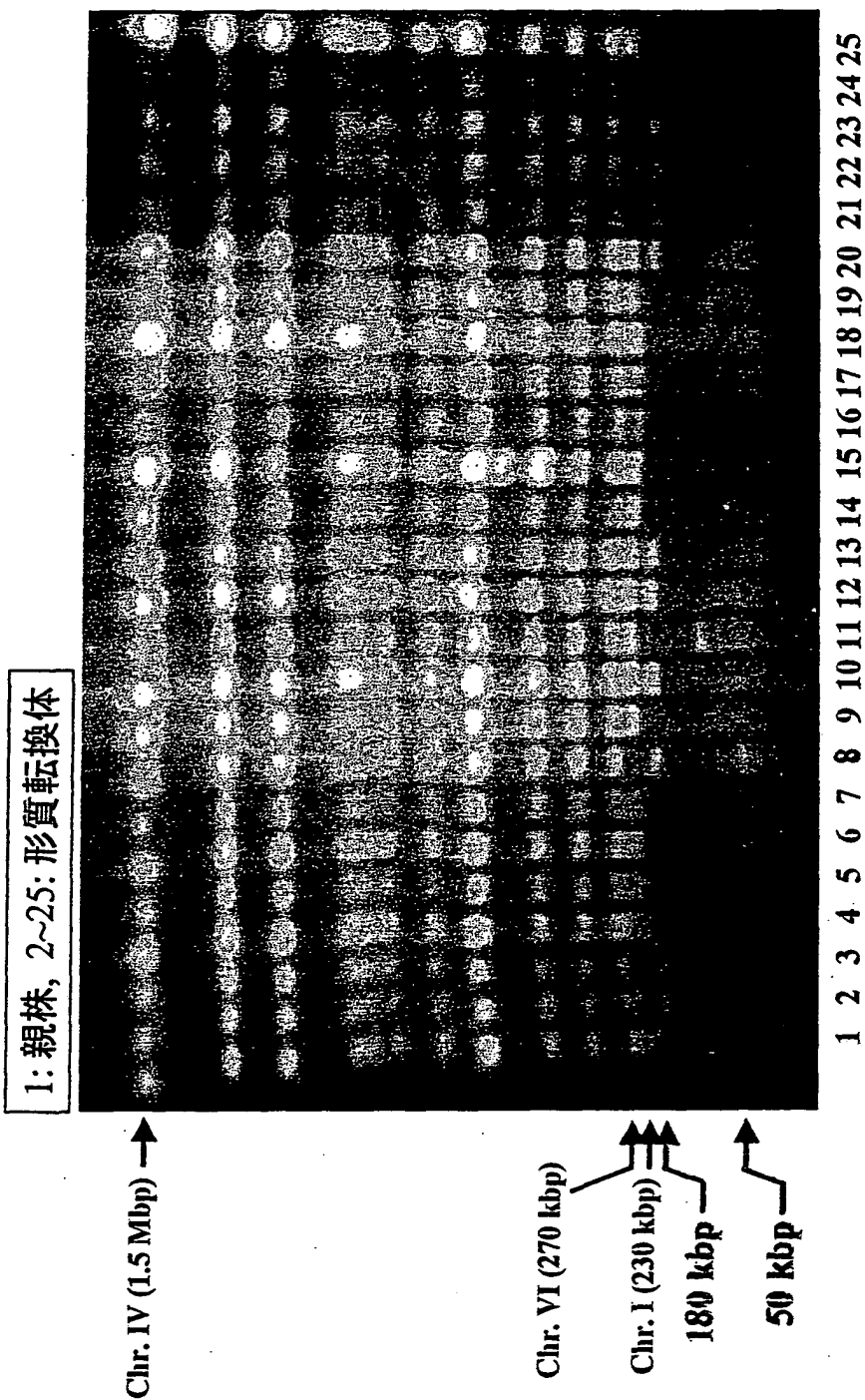
【図 7】



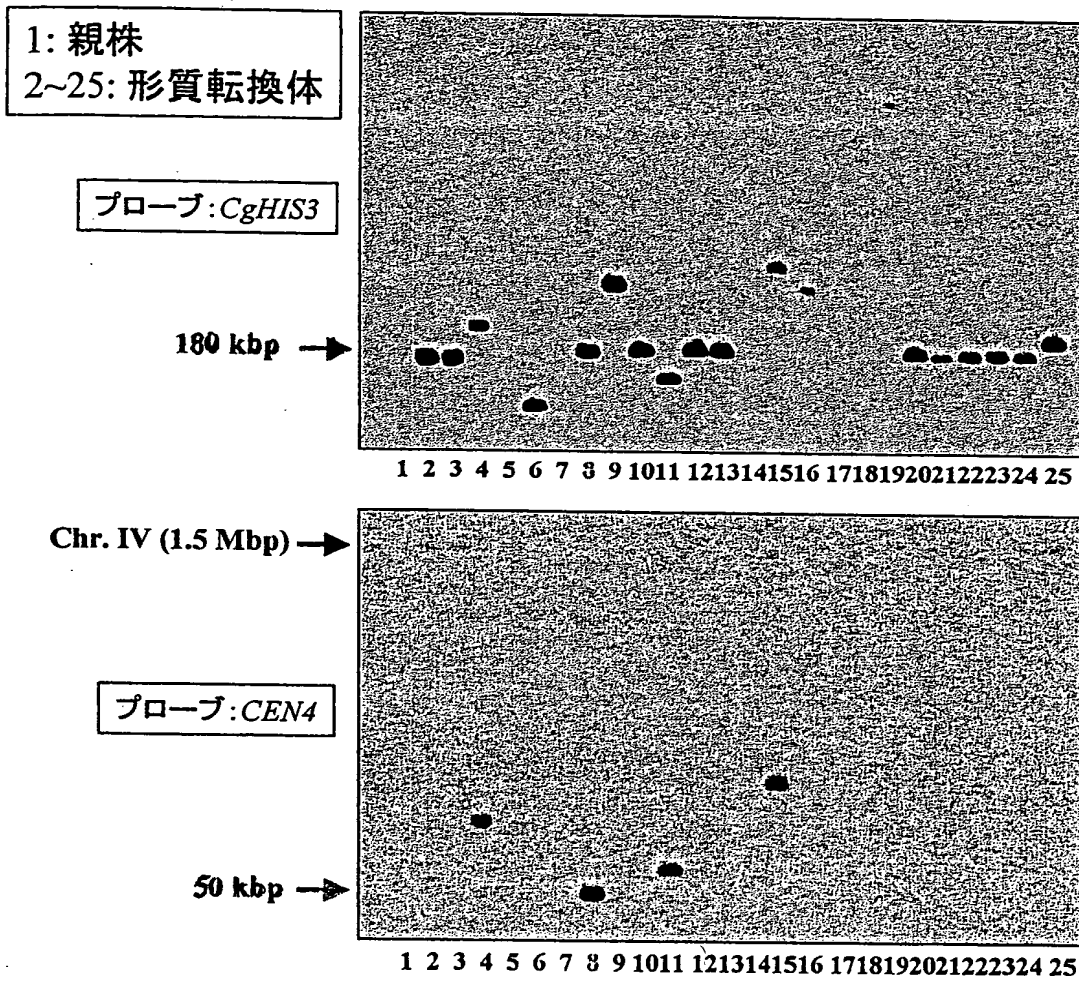
【図 8】



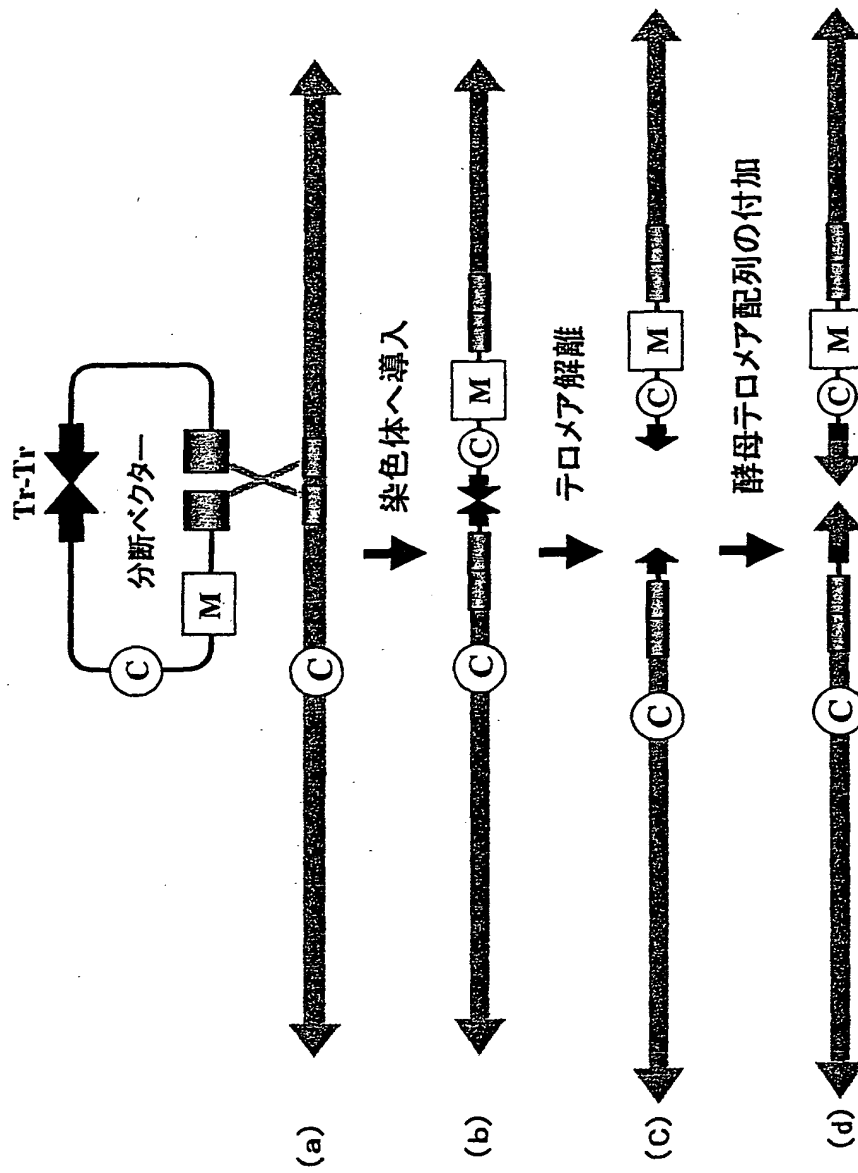
【図9】



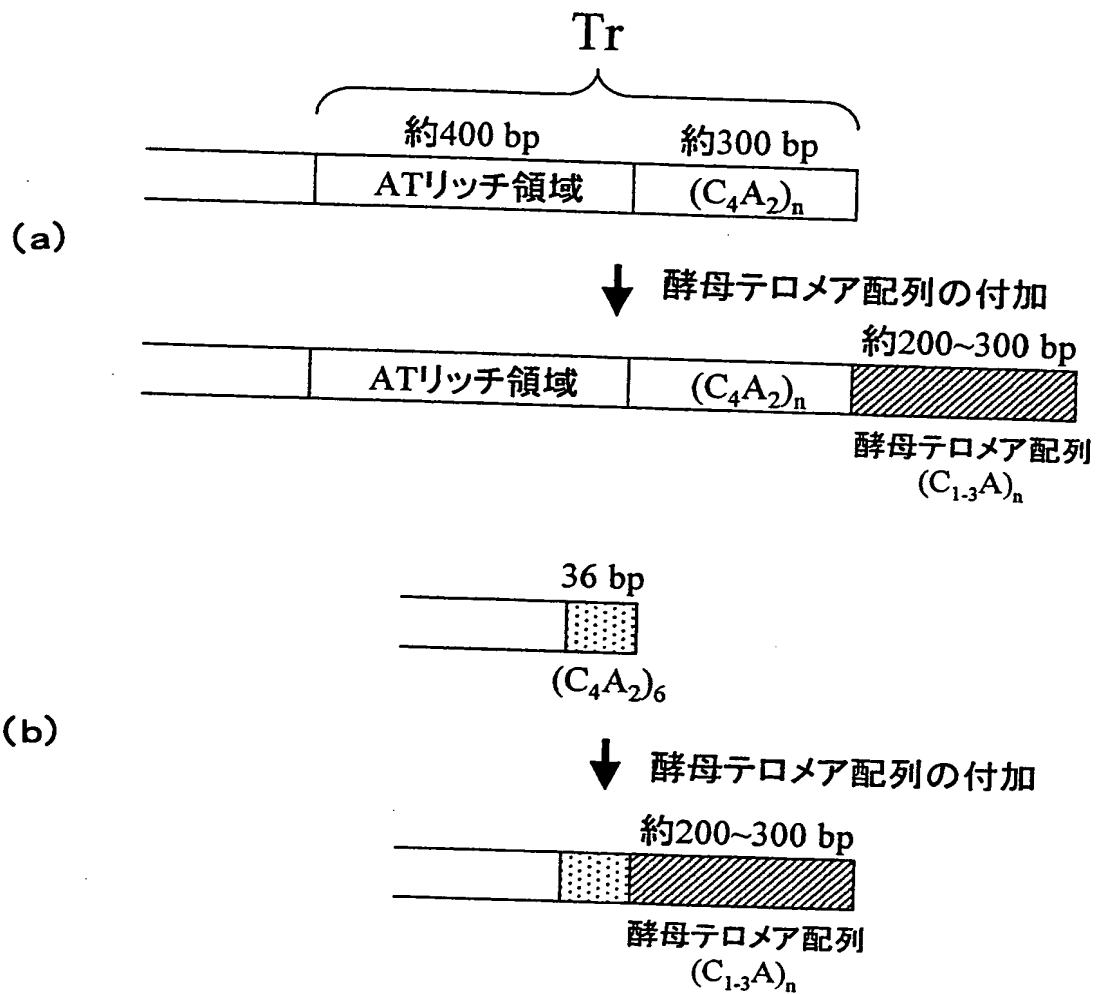
【図 1 0】



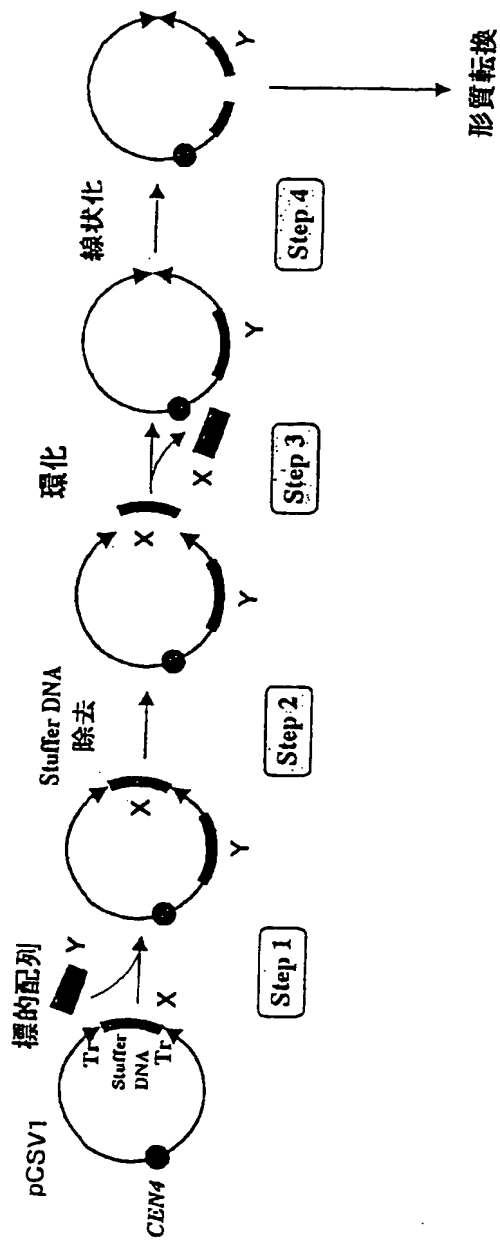
【図 11】



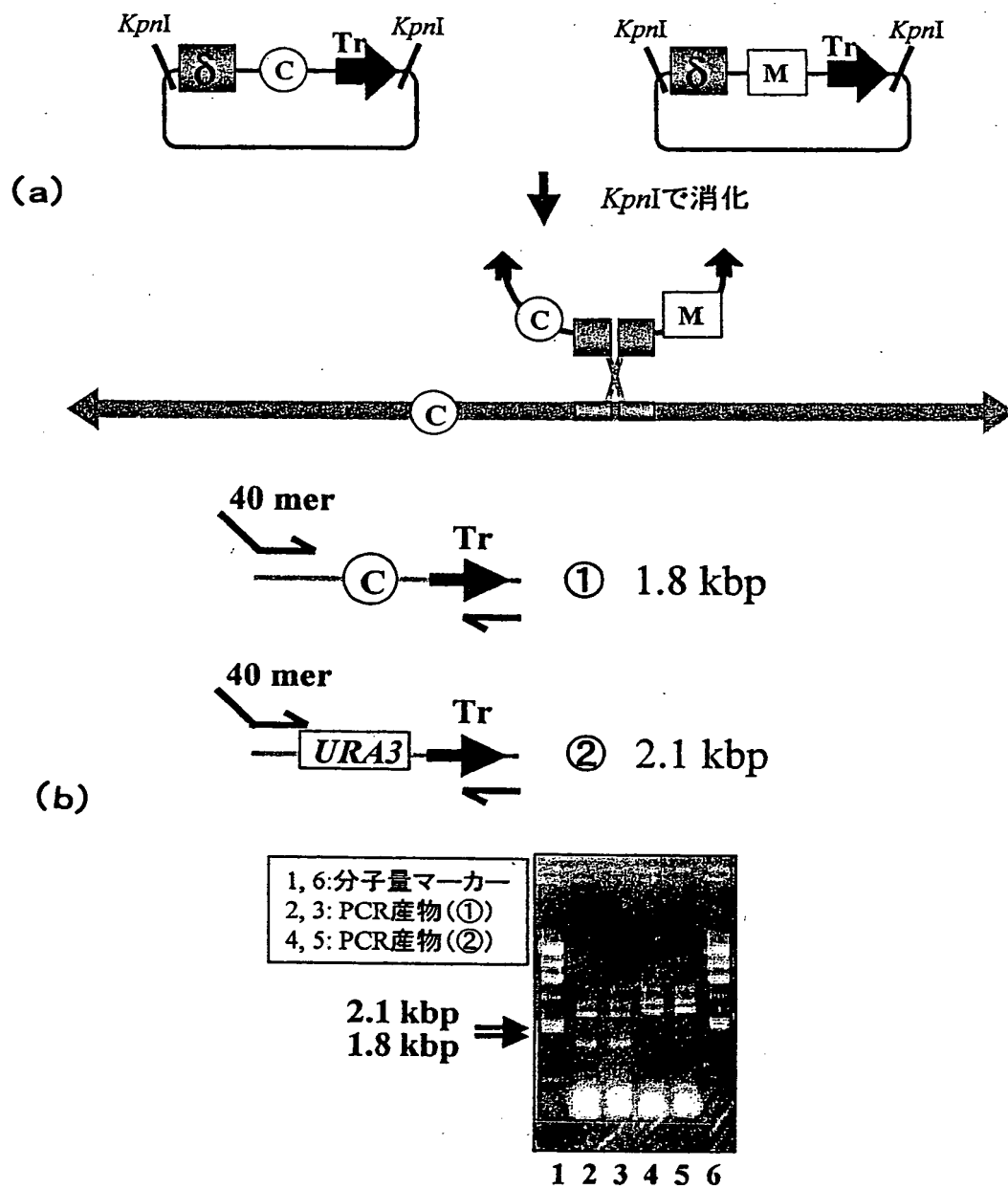
【図 12】



【圖 1 3】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵母内で、染色体を分断・脱落させるために簡易な方法を提供すること。

【解決手段】 標的配列（a）、マーカー遺伝子配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列をこの順で有する線状化染色体分断ベクター（1）を作成する工程；標的配列（b）、酵母染色体のセントロメア配列、および $(C_4 A_2)_n$ 配列をこの順で有する線状化染色体分断ベクター（2）を作成する工程；および該染色体分断ベクター（1）および（2）を酵母に導入する工程を含む、酵母中の染色体の改変方法を提供する。ここで、nはそれぞれ独立して、6～10の整数である。この染色体分断ベクターは、CCCCAAの繰り返し配列を有しているにもかかわらず、PCRで特異的に増幅できるため、従来のDNA分断方法に比べて、極めて簡単にかつ容易に、染色体分断ベクターを調製することができる。そして、この染色体分断ベクターで分断されて生じる分断染色体の $(C_4 A_2)_n$ 配列には酵母テロメア配列が結合されていると考えられるので、分断染色体として機能できる。

【選択図】 図3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391016945]

1. 変更年月日 1991年 1月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府吹田市山田丘1番1号
氏 名 大阪大学長